

植酸含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

植酸 (Phytic acid, 又称为肌醇六磷酸) 在多种植物组织 (特别是米糠与种子) 中作为磷的主要储存形式, 其结构是肌醇的 6 个羟基均被磷酸酯化生成的肌醇衍生物, 对种子的正常生长起着重要作用。植酸具有较强的螯合作用, 近几年的研究发现植酸作为抗氧化剂在保鲜、抗氧化等方面有一定作用。

植酸可使氯化铁-磺基水杨酸紫红色显色剂褪色, 且植酸含量与褪色程度成正比, 通过检测 500 nm 处吸光值的下降量进而得出样品中植酸含量。

二、试剂盒的组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体×2 支	4°C保存	
试剂二	粉体×2 瓶	4°C保存	
标准品	粉体×1 支	4°C保存	若要做标曲则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、离心机、研钵、蒸馏水。

四、植酸含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备：

① 组织样本：

称取烘干粉碎过 50 目筛的干样 0.1g 或鲜样 0.1g, 加入 1mL 提取液, 300rpm 室温震荡提取 30min 后 3800rpm, 4°C或室温离心 10min, 取上清液待测。

【注】：若增加样本量, 可按照组织质量 (g) : 提取液(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】：若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4) : 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接测定, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 500 nm。

② 显色剂 (紫红色) 配制：临用前向一支试剂一中加入 1mL 蒸馏水混匀后全部转移至一瓶试剂二中, 再向试剂一中加入 1mL 蒸馏水涮洗管壁后全部转移至相应试剂二瓶中, 接着向该试剂二瓶中加入 3.5mL 的蒸馏水混匀, 即得到总体积为 5.5mL 的显色剂 (紫红色)。用不完的试剂 4°C保存并在三天内用完。

③ 上清液稀释：可先取 2 个样本预测, 确定适合本批样本的稀释浓度 D: 植酸含量高的样本, 可用提取液做梯度稀释确定最佳稀释倍数, 如稀释 2 倍、5 倍、10 倍。

④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	50	
蒸馏水		50
显色剂	100	100
蒸馏水	50	50

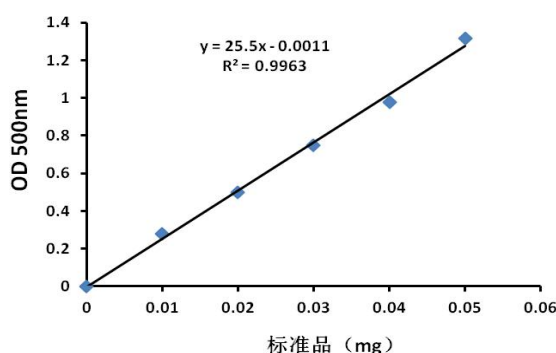
混匀, 2min 后于 500nm 处读取 A 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 测定。

【注】1. 若 A 测定管的值小于 0.2 则需要将样本用提取液稀释后从新检测, 如稀释 5 倍, 稀释倍数 D 带入计算公式重新计算。

2. 若 ΔA 的值小于 0.05, 则需要增加样本上样量 V1, 如增至 100uL, 同时蒸馏水相对减少以保持原体系不变, 则改变后的 V1 重新带入计算公式计算。

五、结果计算:

1. 标准曲线方程: $y = 25.5x - 0.0011$, x 是标准品质量 (mg), y 是 ΔA 。



2. 按样本鲜重计算:

$$\text{植酸}(\text{mg/g}) = [(\Delta A + 0.0011) \div 25.5] \div (W \times V1 \div V) \times D = 0.784 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times D$$

3. 按细胞数量计算:

$$\text{植酸}(\mu\text{g/g}) = [(\Delta A + 0.0011) \div 25.5] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \times D = 784 \times (\Delta A + 0.0011) \div 500 \times D$$

4. 按液体体积计算:

$$\text{植酸}(\text{mg/mL}) = [(\Delta A + 0.0011) \div 25.5] \div V1 \times D = 0.784 \times (\Delta A + 0.0011) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL ;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

D---稀释倍数, 若未稀释则值为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10mg/mL): 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。